

TESIS

**EFEKTIFITAS ANTIBODI ANTI-HA ASAL KUNING
TELUR (IgY) SEBAGAI AGEN IMUNOTERAPI
PADA AYAM YANG DIINFEKSI VIRUS
AVIAN INFLUENZA A/H5NI
CLADE 2.3.2**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS



Oleh

RIO DARLIS AHYARI

NIM 061314453001

**PROGAM STUDI MAGISTER
VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPEUTIKA
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2016**

**EFEKTIFITAS ANTIBODI ANTI-HA ASAL KUNING
TELUR (IgY) SEBAGAI AGEN IMUNOTERAPI PADA
AYAM YANG DIINFEKSI VIRUS AVIAN
INFLUENZA A/H5N1 CLADE 2.3.2**

PENELITIAN EKSPERIMENTAL LABORATORIS

TESIS

**untuk memperoleh gelar Magister
dalam Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika
pada Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga
Surabaya**

**RIO DARLIS AHYARI
NIM. 061314453001**

**PROGRAM STUDI MAGISTER
VAKSINOLOGI DAN IMUNOTERAPETIKA
FAKULTAS KEDOKTERAN HEWAN
UNIVERSITAS AIRLANGGA
SURABAYA
2016**

iii

PERNYATAAN

Dengan ini saya menyatakan bahwa dalam Tesis berjudul :

**Efektifitas Antibodi Anti-HA Asal Kuning Telur (IgY) Sebagai
Agen Imunoterapi Pada Ayam Yang Diinfeksi Virus
Avian Influenza A/H5N1 Clade 2.3.2**

tidak terdapat karya yang pernah diajukan untuk memperoleh gelar Magister di suatu perguruan tinggi dan sepanjang pengetahuan saya juga tidak terdapat karya atau pendapat yang pernah ditulis atau diterbitkan oleh orang lain, kecuali yang secara tertulis diacu dalam naskah ini dan disebutkan dalam daftar pustaka.

Surabaya, 14 Februari 2016



Rio Darlis Ahyari
NIM. 061314453001

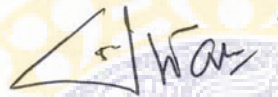
Lembar Pengesahan

TESIS INI TELAH DISETUJUI

Tanggal 15 Februari 2016

Oleh :

Pembimbing Ketua



Prof. Dr. Suwarno, M.Si., drh
NIP. 196105151989031002


Pembimbing



Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, M.Sc., drh
NIP. 195209281978031002

Mengetahui,

Ketua Program Studi Vaksinologi dan Imunoterapetika
Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga



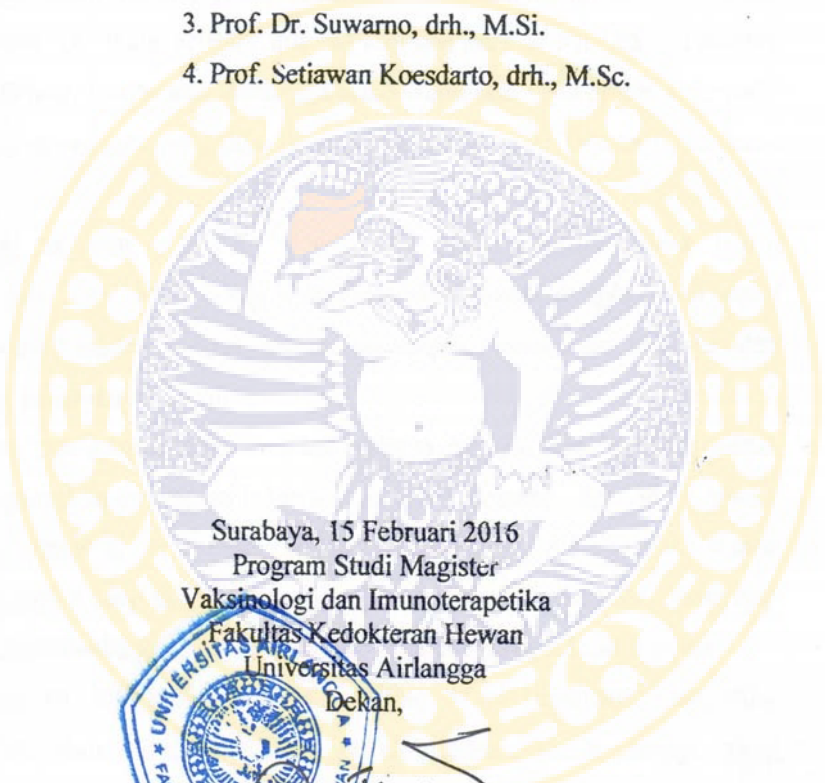
Didik Handijatno, drh., M.S., Ph.D
NIP. 195410181981031001

Tesis ini Telah diuji dan dinilai pada

Tanggal: 11 Februari 2016

PANITIA PENGUJI TESIS

- Ketua : Dr. Jola Rahmahani, drh., M.Kes.
Anggota : 1. Didik Handijatno, drh., MS., Ph.D.
2. Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes.
3. Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si.
4. Prof. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc.



Surabaya, 15 Februari 2016
Program Studi Magister
Vaksinologi dan Imunoterapetika
Fakultas Kedokteran Hewan
Universitas Airlangga
Dekan,



Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes
NIP. 195601051986011001

UCAPAN TERIMA KASIH

Segala puji syukur Kehadirat Allah SWT atas kasih karunia yang telah dilimpahkan sehingga penulis dapat menyelesaikan penulisan tesis yang berjudul **“Efektifitas Antibodi Anti-HA Asal Kuning Telur (IgY) Sebagai Agen Imunoterapi Pada Ayam Yang Diinfeksi Virus Avian Influenza A/H5N1 Clade 2.3.2”**, sebagai salah satu syarat dalam memperoleh gelar Magister di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga Surabaya.

Terima kasih kepada Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga, Prof. Dr. Pudji Srianto, drh., M.Kes dan para Wakil Dekan Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas kesempatan yang diberikan kepada penulis untuk menempuh pendidikan di Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga.

Ketua program studi S2 Vaksinologi dan Imunoterapetika Didik Handijatno, drh., MS., Ph.D. yang senantiasa memberikan motivasi, dukungan moril dan saran kepada penulis selama menempuh pendidikan magister dan penyelesaian penelitian tesis ini.

Proses penyusunan tesis ini tidak terlepas dari peranan berbagai pihak. Penulis mengucapkan terima kasih kepada Prof. Dr. Suwarno, drh., M.Si. selaku pembimbing pertama, Prof. Dr. Setiawan Koesdarto, drh., M.Sc. selaku pembimbing kedua yang telah memberikan komitmen dan dedikasinya yang luar biasa dalam membimbing penulis hingga terselesaikannya penulisan tesis ini.

Kepada Dr. Jola Rahmahani, drh., M.Kes., Didik Handijatno, drh., MS., Ph.D., dan Dr. Hani Plumeriastuti, drh., M.Kes. selaku dosen penguji yang senantiasa memberikan kesediaan untuk memeriksa, menguji dan memberikan masukan dalam penyempurnaan proposal dan tesis.

Seluruh staf pengajar S2 Vaksinologi dan Imunoterapetika Fakultas Kedokteran Hewan Universitas Airlangga atas wawasan keilmuan yang diberikan kepada penulis selama mengikuti pendidikan di program magister.

Kepada kedua orang tua, ayahanda Bapak Mahyudi, Ibunda Sri Rusmami, dan keluarga besar Ibnu Gunawan atas kasih sayang, dukungan dan doa yang diberikan tulus kepada penulis. Kepada yang tersayang dr. Igsana Chyntia Murti terima kasih atas doa, cinta kasih, dukungan dan semangat yang selalu diberikan kepada penulis. Kakak Taufik Indarmawan S.Pi., M.Si dan Adik Farid Yudha Nugraha. yang telah memberi doa, dukungan dan motivasinya.

Rekan-rekan seperjuangan selama menempuh pendidikan di Prodi Vaksinologi dan Imunoterapetika Edy Budi Soesila, drh., Ruri Mega, drh., Amelia Hendriana Wijayanti, drh., Lia Nur Aini, drh., Rizki Kriestya, drh., Dwi Kurniati, drh., Rofiqul A'la, drh., dan Indra, drh. serta seluruh mahasiswa prodi S2 Vaksinologi dan Imunoterapeutika, terima kasih atas kerjasama dan kekompakkannya.

Sahabat-sahabat tercinta di yayasan "TELO CORP" terima kasih atas motivasi dan bantuannya selama ini.

Terima kasih kepada semua pihak, serta seluruh teman-teman yang tidak dapat penulis sebutkan satu persatu yang telah banyak membantu penulis dalam kelancaran penelitian ini.

Surabaya, 14 Februari 2016

Penulis

RINGKASAN**EFEKTIFITAS ANTIBODI ANTI-HA ASAL KUNING TELUR (IgY)
SEBAGAI AGEN IMUNOTERAPI PADA AYAM YANG
DIINFEKSI VIRUS AVIAN INFLUENZA
A/H5N1 CLADE 2.3.2**

Avian influenza (AI) atau Flu burung termasuk penyakit zoonosis. Data dari WHO menunjukkan bahwa sampai dengan 2 Mei 2012 terjadi kasus AI pada manusia di Indonesia mencapai 189 orang dan 157 orang meninggal dunia (WHO, 2012). Pemerintah Indonesia mengupayakan penanggulangan AI pada unggas di fokuskan dengan program vaksinasi, dan sampai saat ini belum memberikan hasil yang maksimal (Ditjen PKH, 2012). Diperlukan pengembangan antibodi spesifik H5N1 yang dimungkinkan sebagai alternatif untuk pengendalian virus AI.

Penelitian ini bertujuan untuk ; (1) Menganalisis aktifitas antibodi anti-HA virus AI sub tipe H5N1 clade 2.1 terhadap infeksi virus AI sub tipe H5N1 clade 2.3.2 dengan melihat antigen pada *cell tropism* melalui preparat IHK. (2) Menganalisis mekanisme pemblokiran antibodi anti-HA terhadap virus AI pada *cell tropism* melalui reseptor *SA alfa 2,3 gal*. (3) Menganalisis potensi antibodi anti-HA dengan kadar 400µg, 200µg, 100µg dan 0µg sebagai produk imunoterapi berdasarkan nilai protektifitas yang ditimbulkan terhadap dosis infeksi virus AI sub tipe H5N1 pada ayam dengan melihat daya tahan hidup.

Penelitian ini dibagi menjadi tiga tahapan yaitu ; Tahap pertama, Formulasi agen imunoterapi antibodi anti-HA dengan berbagai kadar dan mempersiapkan virus sebagai ujiantang, Tahap kedua, ujiantang dan infeksi buatan pada ayam dengan pemberian agen imunoterapi pada waktu yang berbeda. Tahap ketiga, Pemeriksaan preparat imunohistokimia untuk deteksi antigen virus *Avian influenza* dan deteksi pengikatan antibodi anti-HA pada *cell tropism*.

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa ; (1) Antibodi anti-HA clade 2.1 yang berasal dari kuning telur ayam dapat mengikat antigen protein HA dan mampu melindungi ayam dari infeksi virus *Avian influenza A/H5N1* clade 2.3.2. (2) Mekanisme perlindungan terhadap infeksi virus *Avian influenza A/H5N1* terjadi melalui pemblokiran terhadap reseptor *SA alfa 2,3 gal*. (3) Protektifitas antibodi anti-HA yang paling efektif terjadi pada pemberian sehari sebelum infeksi virus *Avian influenza* dengan kadar 400 μ g dan 200 μ g yang nilainya protektifitasnya mencapai 80-100%.

Berdasarkan hasil penelitian ini maka disarankan ; (1) Penggunaan agen imunoterapi antibodi anti-HA (IgY) dapat diterapkan sebagai alternatif untuk melindungi ayam terhadap infeksi virus *Avian influenza A/H5N1* clade 2.3.2 pada ayam pedaging, hal ini dikarenakan vaksinasi pada ayam pedaging dinilai kurang efektif karena umur ayam pedaging yang singkat (sekitar 35 hari). (2) Agen imunoterapi antibodi anti-HA dapat menjadi alternatif sebagai pengganti oseltamivir yang saat ini sudah dilaporkan adanya resistensi terhadap antiviral tersebut. (3) Perlu dilakukan penelitian lanjutan yang bertujuan untuk mengetahui berapa lama agen imunoterapi antibodi anti-HA efektif di dalam tubuh ayam untuk menetralkan infeksi virus *Avian influenza*.

SUMMARY

THE EFFECTIVITY OF EGG YOLK DERIVED ANTI-HA ANTIBODY (IgY) AS IMMUNOTHERAPY AGENT IN THE CHICKEN INFECTED BY CLADE 2.3.2 AVIAN INFLUENZA A / H5N1 VIRUS

Avian influenza (AI) or bird flu is a zoonotic disease. According to WHO, by May 2nd of 2012 there has been 189 reported cases of Human *Avian influenza* in Indonesia, with the fatality rate reaching up to 157. In an effort to control the disease, the government has called on an intensive vaccination program. However, it has not achieved the desired results. The development of H5N1-specific antibody, which may serve as a better alternative in AI virus control, is then necessary.

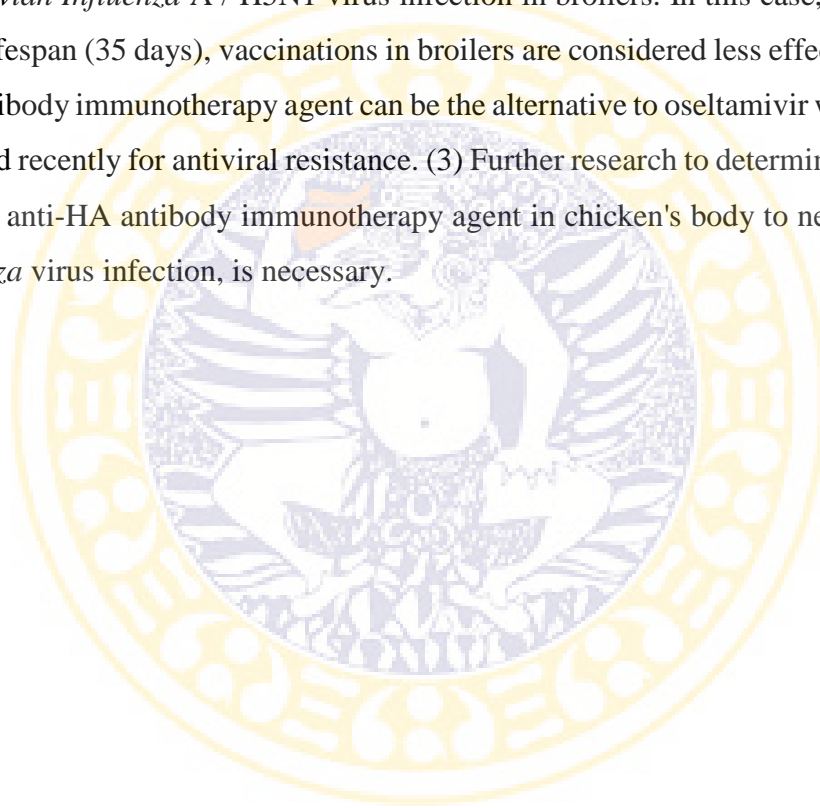
The aims of this research are: (1) to analyze the activity of *Avian influenza* virus subtype H5N1 clade 2.1 anti-HA antibody against the infection of *Avian influenza* virus subtype H5N1 clade 2.3.2 by observation of antigen in *cell tropism* through IHC preparations. (2) to analyze the blocking mechanism of anti-HA antibody towards AI virus in *cell tropism* through *SA alfa 2.3 gal* receptor. (3)) to analyze the potential of anti-HA by the dose of 400µg, 200µg, 100µg and 0µg, as an immunotherapeutic product based on its protection value given by infection dose of AI virus subtype H5N1 in chicken, by survival rate observation.

This research is divided into three stages. First stage is the formulation of immunotherapy agent anti-HA antibody in various concentrations and preparation of virus for challenge test. Second stage is the challenge test and artificial infection in chickens by administering immunotherapy agent in different time periods. Third stage is the observation of immunohistochemical preparations to detect the presence of *Avian Influenza* virus antigen and anti-HA antibodies binding in *cell tropism*.

The results showed that: (1) Egg yolk derived anti-HA clade 2.1 antibody could bind HA protein antigen and could protect chickens from clade 2.3.2 *Avian influenza* A / H5N1 virus infection. (2) The mechanism of protection from *Avian influenza* A /

H5N1 virus infection occurs via the blocking of SA *alfa2.3 gal* receptor. (3) The anti-HA antibody exhibits the highest protective activity when administered on the day before *Avian influenza* virus infection by the dosage of 400µg and 200µg with protection value reaching up to 80 % -100%.

Results suggest that: (1) The use of anti-HA antibody (IgY) as an immunotherapeutic agent can be applied as an alternative to protect chicken from clade 2.3.2 *Avian Influenza A / H5N1* virus infection in broilers. In this case, because of its short lifespan (35 days), vaccinations in broilers are considered less effective. (2) Anti-HA antibody immunotherapy agent can be the alternative to oseltamivir which has been reported recently for antiviral resistance. (3) Further research to determine the effective time of anti-HA antibody immunotherapy agent in chicken's body to neutralize *Avian influenza* virus infection, is necessary.



**THE EFFECTIVITY OF EGG YOLK DERIVED ANTI-HA ANTIBODY (IgY)
AS IMMUNOTHERAPY AGENT IN THE CHICKEN INFECTED BY
CLADE 2.3.2 AVIAN INFLUENZA A / H5N1 VIRUS**

Rio Darlis Ahyari

ABSTRACT

The aims of this research are: (1) to analyze the activity of *Avian influenza* virus subtype H5N1 clade 2.1 anti-HA antibody against the infection of *Avian influenza* virus subtype H5N1 clade 2.3.2 by observation of antigen in *cell tropism* through IHC preparations. (2) to analyze the blocking mechanism of anti-HA antibody towards AI virus in cell tropism through *SA alfa 2.3 gal* receptor. (3) to analyze the potential of anti-HA by the dose of 400µg, 200µg, 100µg and 0µg, as an immunotherapeutic product based on its protection value given by infection dose of AI virus subtype H5N1 in chicken, by survival rate observation. This research is divided into three stages. First stage is the formulation of immunotherapy agent anti-HA antibody in various concentrations and preparation of virus for challenge test. Second stage is the challenge test and artificial infection in chickens by administering the immunotherapeutic agent at different times. Third stage is the observation of immunohistochemical preparations to detect the presence of *Avian Influenza* virus antigen and anti-HA antibody binding in cell tropism. The results showed that: (1) Egg yolk derived anti-HA clade 2.1 antibody could bind HA protein antigen and could protect chickens from clade 2.3.2 *Avian influenza A / H5N1* virus infection. (2) Protection mechanism from *Avian influenza A / H5N1* virus infection occurs via the blocking of *SA alfa2.3 gal* receptor. (3) The anti-HA antibody exhibits the highest protective activity when administered on the day before *Avian influenza* virus infection by the dosage of 400µg and 200µg with protection value reaching up to 80 % -100%.

Key words : anti-HA antibody, immunoglobulin Y, *Avian influenza A/H5N1* clade 2.3.2

DAFTAR ISI

	Halaman
HALAMAN SAMPEL DALAM	ii
PRASYARAT GELAR	iii
PERNYATAAN	iv
PERSETUJUAN	v
PENETAPAN PANITIA PENGUJI	vi
UCAPAN TERIMA KASIH	vii
RINGKASAN	ix
SUMMARY	xi
ABSTRACT	xiii
DAFTAR ISI	xiv
DAFTAR TABEL	xvi
DAFTAR GAMBAR	xvii
DAFTAR LAMPIRAN	xviii
SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG	xix
Bab 1 Pendahuluan	1
1.1 Latar belakang	1
1.2 Rumusan masalah	6
1.3 Tujuan Penelitian	6
1.3.1 Tujuan Umum	6
1.3.2 Tujuan Khusus	6
1.4 Manfaat	7
1.4.1 Manfaat teoritis	7
1.4.2 Manfaat praktis	7
Bab 2 Tinjauan Pustaka	8
2.1 Virus <i>Avian influenza</i>	8
2.2 Protein Hemagglutinin	10
2.3 Patogenesis <i>Avian influenza</i>	11
2.4 Gejala Klinis <i>Avian influenza</i>	13
2.5 Imunoglobulin Yolk	15
2.6 Tinjauan Histologis Paru-paru Ayam	18
2.7 Reseptor Virus <i>influenza</i>	19
2.8 Mekanisme Infeksi Virus <i>Avian influenza</i>	20
2.9 Netralisasi Virus oleh Antibodi	22
BAB 3 Kerangka Konseptual dan Hipotesis	25
3.1 Kerangka Konseptual Penelitian	26

3.2 Hipotesis	28
BAB 4 Materi dan Metode	29
4.1 Jenis Penelitian	29
4.2 Waktu dan Tempat Penelitian	29
4.3 Populasi dan Besar Sampel	29
4.4 Materi Penelitian	30
4.4.1 Alat Penelitian.....	30
4.4.2 Bahan Penelitian	30
4.5 Sampel	31
4.5.1 Virus AI clade 2.3.2	31
4.5.2 Antibodi anti-HA	31
4.6 Metode Penelitian	32
4.6.1 Uji tantang dan infeksi buatan dengan antibodi anti HA	32
4.6.2 Pemeriksaan imunohistokimia	33
4.7 Variabel Penelitian	36
4.7.1 Variabel bebas	36
4.7.2 Variabel tergantung	36
4.7.3 Variabel kendali	36
4.8 Prosedur Pengambilan Data	37
4.8.1 Pemeriksaan preparat histologi	37
4.8.2 Peubah yang diamati	37
4.9 Analisis Data	37
4.10 Kerangka Operasional Penelitian	39
BAB 5 Analisis Hasil Penelitian	40
5.1 Infeksi Buatan dan Uji Tantang Penggunaan Agen Imunoterapi Antibodi Anti-Hemaglutinin pada Ayam	40
5.2 Analisis Antigen Virus <i>Avian influenza</i>	44
5.3 Deteksi Antigen Virus <i>Avian influenza</i> pada Sel Paru dengan Metode Imunohistokimia	44
5.4 Deteksi Pengikatan Antibodi anti-Hamaglutinin pada <i>Cell Tropism</i> dengan Metode Imunohistokimia	48
BAB 6 Pembahasan	52
BAB 7 Kesimpulan dan Saran	58
7.1 Kesimpulan	58
7.2 Saran	58
DAFTAR PUSTAKA	60
LAMPIRAN	65

DAFTAR TABEL

Tabel	Halaman
2.1 Fragmen dan Fungsi Protein AI	9
4.1 Perlakuan terapi dan dosis ujiantang	33
5.1 Protektifitas Agen Imunoterapi Antibodi Anti-HA (IgY) Asal Kuning Telur pada Berbagai Kadar dan Ditantang dengan Virus AI Clade 2.3.2 pada Waktu yang Berbeda	40
5.2 Rerata Jumlah Antigen di <i>Cell Tropism</i>	44



DAFTAR GAMBAR


Gambar	Halaman
2.1 Diagram virus <i>Avian Influenza</i>	8
2.2 <i>Hinge region</i> menghubungkan C 1 dan C 2 pada IgG.....	16
2.3 Perbedaan IgG pada mamalia dan IgY pada unggas	17
3.1 Kerangka Konseptual	25
4.1 Kerangka Operasional	39
5.1 Grafik Daya Tahan Hidup Ayam Terhadap Pemberian Antibodi anti-HA Sehari Sebelum Infeksi	41
5.2 Grafik Daya Tahan Hidup Ayam Terhadap Pemberian Antibodi anti-HA Bersamaan dengan Infeksi	42
5.3 Grafik Daya Tahan Hidup Ayam Terhadap Pemberian Antibodi anti-HA Sehari Sesudah Infeksi	43
5.4 Deteksi antigen virus <i>Avian influenza</i> pada pemberian agen imunoterapi sehari sebelum infeksi dengan menggunakan metode imunohistokimia	45
5.5 Deteksi antigen virus <i>Avian influenza</i> pada pemberian agen imunoterapi sehari bersamaan dengan infeksi dengan menggunakan metode imunohistokimia	46
5.6 Deteksi antigen virus <i>Avian influenza</i> pada pemberian agen imunoterapi sehari sesudah infeksi dengan menggunakan metode imunohistokimia	47
5.7 Deteksi pengikatan antibodi anti-HA pada <i>cell tropism</i> dengan imunohistokimia pada pemberian agen imunoterapi sehari sebelum infeksi	48
5.8 Deteksi pengikatan antibodi anti-HA pada <i>cell tropism</i> dengan imunohistokimia pada pemberian agen imunoterapi bersamaan dengan infeksi	49
5.9 Deteksi pengikatan antibodi anti-HA pada <i>cell tropism</i> dengan imunohistokimia pada pemberian agen imunoterapi sehari setelah infeksi	50

DAFTAR LAMPIRAN

Lampiran	Halaman
1. Analisis Uji Statistik.....	65
2. Uji Etik	73



SINGKATAN DAN ARTI LAMBANG



AI	=	<i>Avian influenza</i>
APC	=	<i>Antigen Presenting Cell</i>
BNT	=	Beda Nyata Terkecil
HA	=	Hemaglutinin
HPAI	=	<i>High Pathogenic Avian influenza</i>
IFN	=	Interferon
Ig	=	Imunoglobulin
IHK	=	Imuno Histo Kimia
IL	=	Interleukin
LPAI	=	<i>Low Pathogenic Avian influenza</i>
M	=	Matrix
mg	=	milligram
ml	=	mililiter
mm	=	milimeter
NA	=	Neurominidase
NP	=	Nucleoprotein
NS	=	Non-Struktural
°C	=	derajat Celcius
OIE	=	<i>Office International des Epizootis</i>
PA	=	Polymerase Acidic
PB	=	Polymerase Basic
PBS	=	Phospat Buffer Saline
pH	=	power Hidrogen
RAK	=	Rancangan Acak Kelompok
RNA	=	Ribonucleic Acid
SPSS	=	<i>Statistical Programs For Social Scientific</i>
TNF	=	Tumor Nekrosis Faktor
WHO	=	<i>World Health Organization</i>
	=	alfa
	=	beta
	=	gama
%	=	persen
µg	=	mikrogram
µl	=	mikroliter